第 37 卷第 19 期
2017 年 10 月

生 态 学 报
ACTA ECOLOGICA SINICA

Vol.37,No.19
Oct.,2017

DOI: 10.5846/stxb201607151442
王鋆燕, 卢圣鄂, 陈小敏, 李跃飞, 辜运富.若尔盖高原湿地泥炭沼泽土亚硝酸盐还原酶(*nirK*)反硝化细菌群落结构分析.生态学报,2017,37(19):6607-6615.
Wang Y Y, Lu S E, Chen X M, Li Y F, Gu Y F. Analyzing the nitrate reductase gene (*nirK*) community in the peat soil of the Zoige Wetland of the Tibetan Plateau. Acta Ecologica Sinica,2017,37(19):6607-6615.

若尔盖高原湿地泥炭沼泽土亚硝酸盐还原酶(*nirK*)反硝化细菌群落结构分析

王鋆燕, 卢圣鄂, 陈小敏, 李跃飞, 辜运富*
四川农业大学资源学院,成都 611130

摘要:若尔盖泥炭湿地是世界少有的低纬度永久冻土湿地,具有高海拔、高紫外辐射、高有机质的特点。该区域 N_2O 的排放量对全球气候变暖有重要影响。对若尔盖高原湿地泥炭沼泽土中的亚硝酸盐还原酶(*nirK*)反硝化细菌群落结构多样性进行分析,以期揭示该区域 N_2O 释放的微生物调控机制。基于若尔盖高原湿地泥炭沼泽土的理化性质和反硝化活性(PDA),结合限制性酶切片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术、克隆文库及分子测序对该生态系统中的 *nirK* 反硝化细菌群落结构及多样性进行分析。反硝化活性测定结果显示:阿西地区>麦溪地区>分区地区,反硝化活性与土壤有机碳、总氮和丰富度呈显著正相关($P<0.05$)。Shannon-wiener 多样性指数以阿西最高、分区最低。3 个样品中共测序 15 条 *nirK* 基因代表序列,系统发育表明若尔盖高原湿地优势 *nirK* 反硝化菌群为变形门菌群。其中,阿西地区主要为 α-变形菌门,麦溪地区主要为 β-变形菌门,分区地区无法确定优势种群。冗余分析(Redundancy analysis, RDA)显示:有效钾和有效磷是影响 *nirK* 反硝化细菌群落结构的关键环境因子。本论文显示,若尔盖高原湿地存在着明显的反硝化作用,调控这些反硝化作用的 *nirK* 反硝化细菌多样性较高,且与土壤有效钾和有效磷密切相关。

关键词:若尔盖高原湿地;泥炭沼泽土;反硝化活性;*nirK*;多样性

Analyzing the nitrate reductase gene (*nirK*) community in the peat soil of the Zoige Wetland of the Tibetan Plateau

WANG Yingyan, LU Sheng'e, CHEN Xiaomin, LI Yuefei, GU Yunfu*
College of Resource, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, *China*

Abstract: The Zoige Wetland, which is located in the northeast of the Tibetan Plateau, is a typical low latitude permanent permafrost wetland, with high altitude intensive ultraviolet radiation and high soil organic matter content. The nitrous oxide fluxes in this area are critical to global warming. The main objective of this study was to elucidate the diversity and structure of the nitrate reductase (*nirK*) gene denitrifier community, and to further explore the microbial mediated mechanism of N_2O release in this climatically extreme area. Based on the soil physicochemical properties and denitrifying activity (PDA) analysis, restriction fragment length polymorphism (RFLP), clone library and sequencing were further used to analyze the diversity and structure of the *nirK* gene in the denitrifier community. The results showed that the highest activity of PDA was detected in the Axi soil, while the lowest activity was in the Fenqu soil. The PDA was significantly and positively correlated with soil organic carbon, total nitrogen and *nirK* gene richness ($P < 0.05$). The highest and lowest Shannon-Wiener diversity indices were detected in Axi and Fenqu soils, respectively. Based on the RFLP patterns, 15 different *nirK* gene

基金项目:国家自然科学基金(41201256)
收稿日期:2016-07-15; **网络出版日期**:2017-05-27
* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: guyf@ sicau.edu.cn.

clones were selected for sequencing and further phylogenetic analysis. The phylogenetic analysis showed that the majority of the *nirK*-denitrifiers in the peat soil of the Zoige Wetland belonged to *Proteobacteria*, and the dominant species in the Axi soil were *Alphaproteobacteria*, whereas *Betaproteobacteria* species dominated in the Maixi soil. The dominant *nirK* denitrifiers remained unidentified in the Fenqu soil. Redundancy analysis (RDA) was used to explore the possible relationship between the *nirK* denitrifiers community and soil physicochemical parameters, and the results showed that soil available potassium and available phosphorus were the two most important factors in shaping *nirK* denitrifier communities. In conclusion, the current study revealed obvious denitrifying activities in the Zoige Plateau Wetland. The *nirK* gene denitrifying community, which plays an important role in mediating the denitrifying process, was relatively diverse and positively influenced by soil available potassium and available phosphorus.

Key Words: Zoige Plateau Wetland; peat marsh soil; potential denitrifying activity; *nirK* gene; diversity

反硝化作用主要是由反硝化细菌介导在厌氧条件下将氮氧化合物(NO_3^- 和 NO_2^-)作为离子受体转化为气态氮(NO、N_2、N_2O)的生物异化过程[1]。此过程的中间产物 NO 和 N_2O 导致温室效应和臭氧层空洞[1]。反硝化细菌种群丰富,仅凭 16S rRNA 基因难以真实反映环境中反硝化细菌的系统发育特征即脱氮显型不能通过系统发育进行推断,需要利用编码反硝化酶的功能基因作为分子标记来进行反硝化菌的研究[2-3]。研究表明,反硝化反应涉及 4 种反硝化关键酶,分别是硝酸盐还原酶,亚硝酸盐还原酶和异化亚硝酸盐还原酶以及氧化亚氮还原酶。其中,由亚硝酸盐还原酶调控的将亚硝酸盐还原成 NO 的反应是区分硝酸盐呼吸菌和反硝化菌的关键步骤[4]。亚硝酸盐还原酶包括 2 种不同结构形态,一种由含有铜基(Cu-nir)的 *nirK* 基因编码,另一种由含有亚铁血红素 cdl(cd1-nir)的 *nirS* 基因编码[2]。其中 *nirK* 基因存在于许多亲缘关系较远的菌株中;而 *nirS* 基因反硝化细菌以假单胞菌占优势[4],可见,将 *nirK* 基因作为分子标记可以更全面真实的反应环境中的反硝化菌群结构。近年来,*nirK* 基因作为分子标记被广泛用于不同生境反硝化细菌群落结构及反硝化活性的研究,如:森林土壤、草甸土、海洋底泥以及农业土壤等,且生境不同对 *nirK* 反硝化菌群起决定作用的环境因子也不同[5-9]。故利用 *nirK* 基因作为分子标记研究若尔盖高原湿地的反硝化菌群结构和多样性,对于深入认识若尔盖高原湿地反硝化作用的微生物调控机制具有重要意义。

湿地,被称作为"地球之肾",在调控全球元素的生物地球化学循环中起着重要作用。若尔盖高原湿地位于青藏高原东北隅,是世界上为数不多的低纬度永久冻土湿地,具有高海拔、高紫外辐射、高有机质含量等特点[10]。同时,若尔盖高原湿地也是我国乃至全球面积最大的高原泥炭沼泽群[11],是中国生物多样性研究关键地区,也是全球气候变化的热点地区[12]。目前,研究人员针对该区域的碳循环特征[13-14]及相关微生物调控机制[15]进行了较系统地研究,而对该区域温室气体 N_2O 排放的微生物调控机制研究却鲜见报道。

本文结合限制性酶切片段长度多态性(RFLP)技术、克隆文库及测序等手段对若尔盖高原湿地泥炭沼泽土中 *nirK* 反硝化细菌的群落结构和多样性进行分析,并通过冗余分析(RDA)来探索影响 *nirK* 反硝化细菌的关键环境因子。以期揭示若尔盖高原湿地生态系统反硝化活性与反硝化菌群间的内在联系,为深入认识该生境的反硝化作用微生物调控机制提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究去概况

若尔盖高原湿地位于青海-西藏高原东部边缘的四川、甘肃和青海省的三省交界地区(32°20′—34°00′N, 101°30′—103°30′E;面积 $3.94\times10^4 hm^2$,平均海拔高度 3500 m)。在青藏高原影响下该地区特殊的大陆性高原气候环境,四季不分,长冬无夏,降水多,湿度大,霜冻期极长。年平均温度为 1.1 ℃ (年最高温度为 10.9 ℃,年最低温度-10.3 ℃),年平均降水量为 560—860 mm[16]。沼泽土全年被水和植被覆盖,主要植被为水生植物和莎草科的水生-中生植物(木里苔草、毛果苔草和乌拉苔草),土壤母质为均质粉砂和粘土[10]。相关采样点

信息见表 1。

表 1　采样点信息

Table 1　Details of the sampling sites

样品编号 Sample code	采样点 Sampling site	经度 Longitude	纬度 latitude	海拔 Altitude/m	土壤温度 Soil temperature/℃
1	麦溪	102°49′ 02.8″	33°54′57.0″	3487	-5
2	阿西	102°48′ 48.2″	33°54′58.2″	3452	-6
3	分区	102°48′ 59.4″	33°55′21.2″	3462	-5

1.2　采样方法

2012 年 8 月在查阅有关资料的基础上,选取阿西、麦溪和分区 3 个面积最大的典型牧区为研究区域,采集这 3 个区域被乌拉苔草覆盖的泥炭沼泽土为研究样品,按照“梅花型”原则进行采样,样地面积约 0.15 hm^2,布设 3 个采样点,用土钻取 10—20 cm 的土样,按四分法进行混匀,分别取 1 kg 混后土样,得到三等份样品,用无菌 PET 树脂袋封装,放于冰盒中带回实验室。土样于-20 ℃冰箱保存以备后续分析。

1.3　土壤理化性质与反硝化活性

土壤含水量(WC)在 105 ℃烘干 48 h 后检测[17]。有效氮(AN)通过碱解扩散法进行分析[18]。土壤有机质(SOM) 、pH 值、总氮(TN)、总磷(TP)、有效磷(AP)、总钾(TK)、有效钾(AK)采用 Liu 等人[19]的方法进行分析。土壤理化性质见表 2。

土壤反硝化活性测定采用乙炔抑制法[20]:称取新鲜土壤样品 25 g (以干土计) 放入 250 mL 三角瓶,添加 25 mL 溶液(包含 1 mmol/L 葡萄糖和 1 mmol/L KNO_3)。用惰性气体氦气冲洗三角瓶,抽取瓶中土样上方 10%的气体,添加抽取气体同体积的无丙酮乙炔气体,同时以不加乙炔气体的样品为对照。在 20 ℃、225 r/min 条件下振荡土壤泥浆,在 1 h 和 5 h 用注射器抽取气样,用气相测谱仪分析气样。

N_2O 浓度测定:N_2O 浓度用美国安捷伦公司生产的 Agilent-7890A 气相色谱仪测定,检测器为电子捕获器,分离柱内填充是 Porapak Q,计算机程序控制定量管(1 mL)和通气阀自动进样,将空气样品中水分在进入检测器前反吹掉,载气为甲烷-Ar 混合气,流速为 60 mL/min。分离柱温度、进样口温度和检测器温度分别为 60 ℃、100 ℃和 300 ℃。

1.4　土壤总 DNA 提取

利用 Fast DNA spin kit for soil 试剂盒(MP BIO, Inc., Irvine, CA, USA)根据制造商提供的说明进行提取。洗脱后总 DNA 体积为 50 μL。利用 1%的琼脂糖凝胶电泳确认总 DNA 的条带的单一性,同时用 Nano-200 核酸检测仪(AoSheng, Hangzhou, China)检测浓度。

1.5　*nirK* 基因的扩增

所用引物为:nirK517F (5′-TTYGTSTAYCACTGCGCVCC- 3′) 和 nirK1055R (5′-GCYTC- GATCAGRTTR TGGTT-3′)[21]。PCR 扩增程序采用 TOUCHDOWN 程序。选用 50 μL 反应体系,分别是 PCR Mix 25 μL,DNA 模板取 6 μL,引物(10 μmol/L)各 1 μL,超纯水补足 50 μL。扩增程序:95 ℃预变性 5 min,94 ℃ 30 s,57—47℃ 45 s(每个 3 循环温度降低 2 ℃),72 ℃ 1 min,15 个循环;其它条件不变,在 47 ℃退火温度下继续扩增 25 个循环,终延伸 72 ℃ 7 min。取产物 2.0 μL 在含 EB 的 1%琼脂糖凝胶上水平电泳检测,120 V 电泳 30 min。用凝胶成像系统(Bio-Rad, USA)拍照检测。PCR 产物置于 4 ℃冰箱保存。

1.6　克隆与 RFLP 分析

利用 PCR Clean-Up™试剂盒(MO BIO Labs, Solana Beach, CA, USA)对扩增 PCR 产物进行纯化,纯化产物通过 pGEM-T 载体(Promega)进行克隆。根据“蓝白斑”(抑制剂:X-Gal、Amp^r和 IPTG)对克隆子进行筛选。3 个样品平板培养基共挑取 270 个白色克隆子。利用 *nirK* 基因引物(如 1.5 所示)进行扩增,获得 250 个 *nirK* 基因阳性克隆子。

将 PCR 产物用 *Msp* I 和 *Ava* II 限制性内切酶(Promega)进行双酶切。酶切体系总体积为 10 μL,包括:2 U 的限制性内切酶、8 μL 的 PCR 产物和限制缓冲剂。酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳 80V 60min 进行分离,所用琼脂糖凝胶浓度为 2%。

根据限制性片段多样性条带的类型,选取 15 个代表克隆子送上海生工生物有限公司进行序列测定并将获得的基因序列提交 NCBI 以获取基因登录号。序列登录号为:KX018494-KX018508。

1.7　数据处理

基础数据处理利用 Excel 2010 进行,单因素方差分析和皮尔逊相关分析利用 SPSS 21.0 (SPSS Inc. Chicago)完成。*nirK* 反硝化细菌群落结构多样性通过 Shannon 多样性指数(*H*),丰富度(*S*)、均匀度(*Eh*)[22] 和覆盖率(C)[23] 进行计算。利用 MEGA 5.0 软件,通过最大相邻法构建 *nirK* 基因序列系统发育树。利用 CANOCO5.0 软件对土壤理化性质和 *nirK* 基因反硝化群落结构进行冗余分析(RDA)。

2　结果与分析

2.1　土壤理化性质与反硝化活性

3 个土壤样品的理化性质见表 2。其中,阿西地区样品的水含量、反硝化活性、土壤有机质、总氮和有效氮最高;而麦溪地区样品 pH 值、总磷、总钾、有效磷和有效钾是最高的。相较于以上两个地区样品,分区地区样品的理化性质值相对较低。

表 2　若尔盖高原泥炭沼泽土理化性质

Table 2　Physicochemical parameters in the peat marsh soil of the Zoige plateau

样品编号 Sample code	水含量 WC/%	pH	土壤有机碳 SOC/(g/kg)	总氮 TN/(g/kg)	总磷 TP/(g/kg)	总钾 TK/(g/kg)	有效氮 AN/(mg/kg)	有效磷 AP/(mg/kg)	有效钾 AK/(mg/kg)
1	5.12±0.09b	7.86±0.03a	281.25±1.39b	5.29±0.05b	1.43±0.14a	7.44±0.03a	1025.88±1.95b	26.01±0.26a	99.83±0.40a
2	6.28±0.10a	7.61±0.02a	303.09±0.96a	5.91±0.07a	1.41±0.17a	6.79±0.08b	1079.43±3.03a	22.63±0.11c	96.67±0.10b
3	4.88±0.04b	6.85±0.04b	239.14±0.04c	4.55±0.06c	1.32±0.17b	7.30±0.06a	993.00±3.05c	24.72±0.11b	98.33±0.22a

WC: Water content; SOC: Soil organic carbon; TN: Total nitrogen; TP: Total phosphorus; TK: Total potassium; AN: Available nitrogen; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium;结果:平均值±标准误;每栏数据在 $P < 0.05$ 水平下的显著差异

反硝化活性范围为:33.52—52.77 ng N_2O-N g^{-1} ds h^{-1},最高值出现于阿西地区,最低值位于分区地区(图 1)。皮尔逊相关分析显示:反硝化活性与土壤有机碳、总氮和丰富度呈显著正相关(表 3)。

表 3　土壤理化性质、反硝化活性与 *nirK* 反硝化细菌群落的皮尔逊相关分析

Table 3　Pearson correlation between soil physicochemical parameters, potential denitrifying activity and *nirK* denitrifier community

	水含量 WC	pH	土壤碳含量 SOC	总氮 TN	总磷 TP	总钾 TK	有效氮 AN	有效磷 AP	有效钾 AK	反硝化活性 PDA
反硝化活性(PDA)	0.889	0.796	0.998 *	0.998 *	0.835 *	−0.665	0.969	−0.519	−0.426	1
Shannon-Wiener 多样性指数(*H*)	0.998 *	0.491	0.889	0.941	0.550	−0.906	0.988	−0.815	−0.749	0.918
丰富度(*S*)	0.916	0.756	0.992	1.000 **	0.799	−0.711	0.982	−0.572	−0.481	0.998 *
均匀度(*Eh*)	0.993	0.535	0.912	0.957	0.592	−0.884	0.994	−0.785	−0.714	0.937

WC: Water content; SOC: Soil organic carbon; TN: Total nitrogen; TP: Total phosphorus; TK: Total potassium; AN: Available nitrogen; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium; PDA: Potential denitrifying activity;表中数据为:相关系数(r); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2.2　*nirK* 基因群落文库和限制性片段长度多态性分析

限制性片段多态性分析显示(表 4),3 个地区共包括 15 个 OTUs,不同地区所包含的 OTU 类型存在一定差异。其中阿西地区所包含 OTU 类型最多,麦溪次之,分区最少。其中 OTU1、2、5、8、11、12 为 3 个地区共有,OTU13、OTU14 为阿西地区特有;OTU7 为麦溪地区特有;OTU15 为分区地区特有。

克隆文库的覆盖率用于分析土壤微生物群落的多样性,文库中的特有 OTU 类型越多则多样性的覆盖率越低[24]。本文 3 个地区各自的克隆文库的覆盖率都高于 91%(表 4),充分说明所构建的克隆文库几乎全部覆盖地区里的 *nirK* 基因种类。同时,克隆文库也可以代表若尔盖高原湿地泥炭沼泽土中 *nirK* 反硝化群落的特征。

基于 RFLP 数据计算 *nirK* 基因群落的 Shannon 多样性指数(*H*)、丰富度(*S*)以及均匀度(*E*h)(表 4)。*nirK* 基因反硝化细菌群落多样性在 3 个采样点的差异不明显。Shannon-Wiener 多样性指数的变化范围为:2.91—2.49,其中阿西采样点多样性指数、丰富度和均匀度最高,麦溪次之,分区最小。通过表 3 皮尔逊相关分析显示:香依-威尔多样性指数与水含量显著相关($P<0.05$)。丰富度与总氮极显著相关($P<0.05$)。而均匀度与各理化性质的相关性不明显。

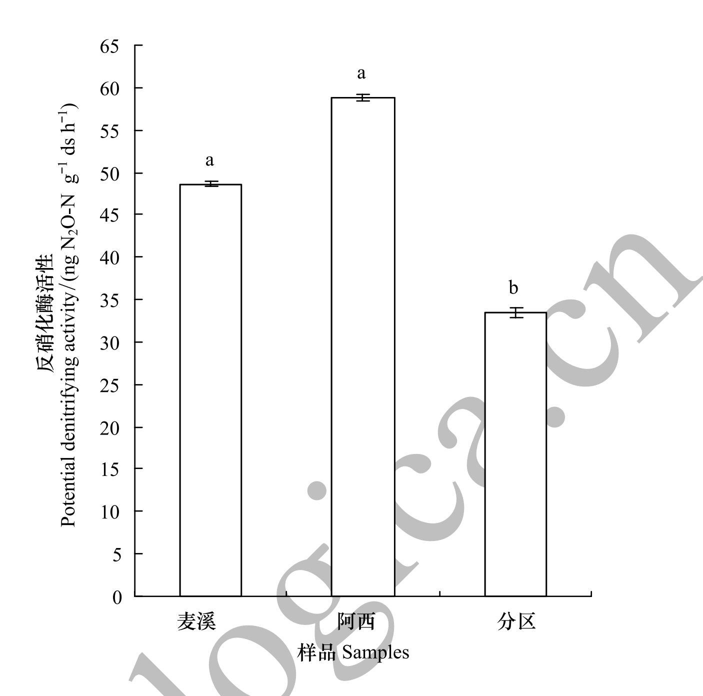


图 1　若尔盖高原湿地泥炭沼泽土的反硝化活性

Fig. 1　Potential denitrifying activity of the peat marsh soil in Zoige plateau wetland

图中小写字母表示反硝化活性在 $P < 0.05$ 水平上的显著差异

2.3　系统发育地位分析

基于 RFLP 图谱,同一 RFLP 类型下选取一个克隆序列作为一个 OTU。已测序的 15 个阳性克隆序列长度均约为 530 bp。根据 Palmer 的方法[25],将 82%作为序列相似性标准,可以将 *nirK* 序列定位到属的水平。系统发育分析显示:15 条序列中,10 条与变形门细菌相似(图 2),包括 Alpha-*Proteobacteria* 和 Beta-*Proteobacteria* 两个纲。还有 5 条序列无法确定其分类地位。

表 4　若尔盖高原湿地泥炭沼泽土 *nirK* 反硝化细菌多样性

Table 4　The diversity of *nirK* denitrifiers in peat marsh soil in the Zoige plateau wetland

限制性内切酶 Restriction enzyme	样品编号 Sample codes	OTU 类型 OTU type	覆盖率(C) Coverage ratio	多样性指数(*H*) Shannon-wiener Diversity index	丰度(*S*) Richness	均匀度(*Eh*) Evenness
Msp I	1	12	0.9539±0.02a	2.59±0.02b	3.12±0.04b	0.87±0.02a
和 Ava II	2	13	0.9653±0.03a	2.91±0.04a	3.38±0.07a	0.92±0.02a
	3	10	0.9346±0.02b	2.49±0.06b	2.81±0.02 c	0.85±0.02a

结果为平均值±标准误;每栏数据在 $P < 0.05$ 的水平下显著差异

Alphaproteobacteria 纲是若尔盖泥炭沼泽土最优势的 *nirK* 反硝化菌群,占克隆子总数的 51.0%,有 5 个 OTU 属于这个类群(Cluster3、Cluster4)。其中,丰度最高的 OTU12,在 250 个正确插入片段的克隆子中占有 43 个,与 GenBank 可培养反硝化细菌 *Rhodopseudomonas* sp. 2—8 (GU332847)在核酸水平上具有 85%的序列相似性。此代表序列来自不同的生境,如沼泽土、农田土壤、酸性土壤、水稻土等。丰度第二的 OTU14 包括 27 个克隆子,占克隆子总数的 10.8%,多来源于海底底泥、农业土壤等。OTU13 的源于城市污水处理厂。此外,属于 OTU12、OTU13 和 OTU14 的克隆子主要来自阿西地区,显示阿西采样点中的优势种群属于 *Alphaproteobacteria* 纲。

Betaproteobacteria 纲包含 5 个 OTU,占克隆子总数的 38%。OTU8 最丰富,该 OTU 占克隆子总数的14.4%,与可培养反硝化细菌 *Achromobacter xylosoxidan* (AB969826)具有 84%的序列相似性。其相似序列来源于草甸土和农田土壤,相似度在 82%—89%之间。此外, OTU6—9 的克隆子大部分来自麦溪地区,显示麦溪采样点中的优势种群属于 *Betaproteobacteria* 纲。还有部分 OTU 无法确定其分类地位(Cluster 1),占克隆子总数的

11%。分区采样点的克隆序列大多属于此类。以上 OTU 相似的序列大多来自于冰川,海滩、高山贫营养湖、农业土壤、河口、内陆湖底泥等,序列相似度在 85%—89%之间。

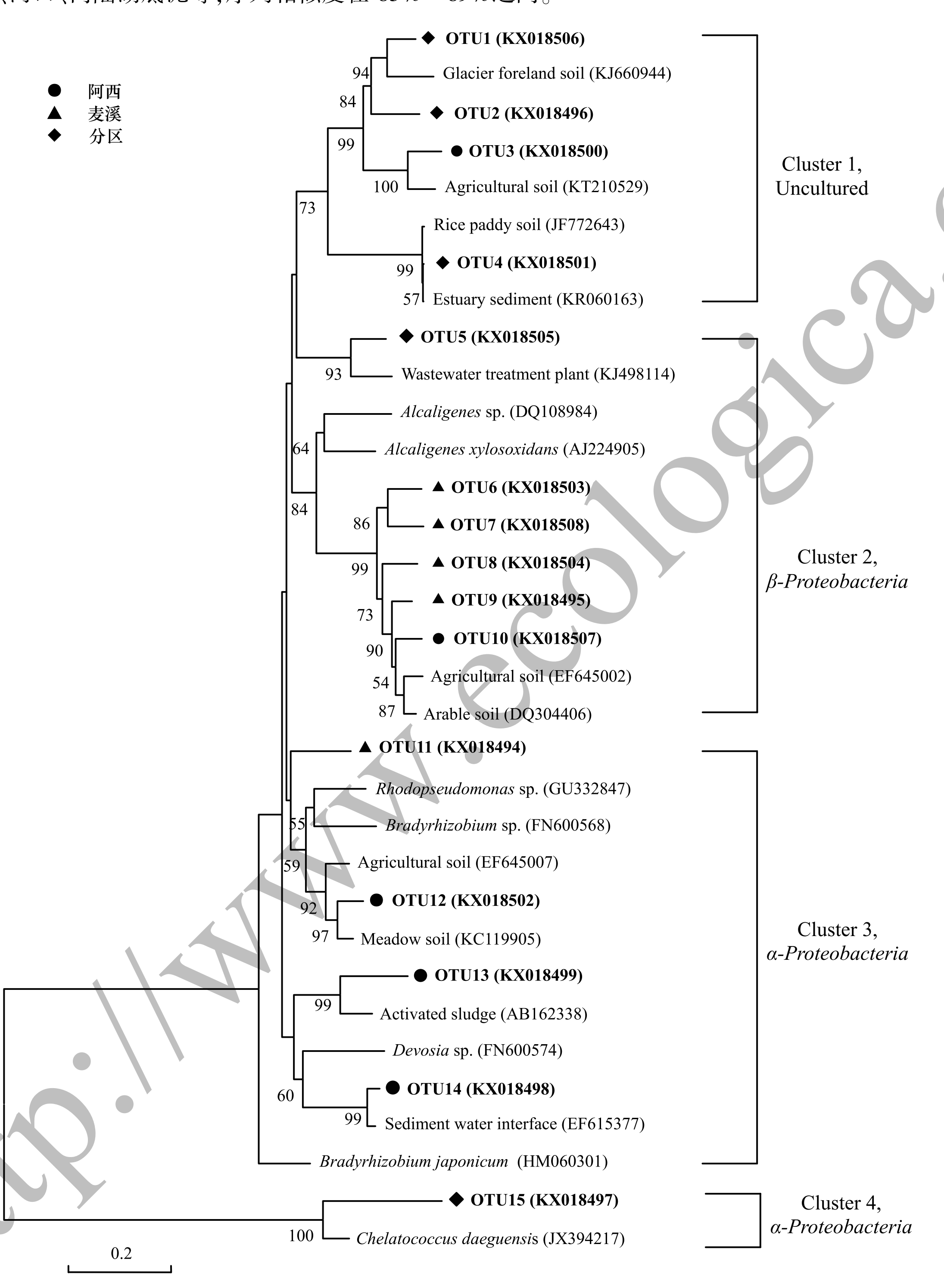


图 2 若尔盖高原湿地泥炭沼泽土 *nirK* 反硝化细菌的系统发育分析

Fig.2 Phylogeny analysis of the *nirK* denitrifiers of the peat marsh soil in Zoige plateau wetland

在树节上的数字代表 1 000 取样的百分比,仅显示大于 50%的情况

2.4 *nirK* 反硝化细菌群落结构与土壤理化性质的冗余分析

若尔盖高原湿地泥炭沼泽土 *nirK* 反硝化细菌群落与土壤理化性质之间的 RDA 相关性见图 3。分析结果显示:第一排序轴的特征值为 0.97,第二排序轴特征值为 0.02。由图可知,第一排序轴与有效磷、有效钾关系

最为密切,均达到极显著水平($P<0.01$)。第二轴与土壤有机碳、总氮、总磷和有效氮较为密切,均达到显著水平($P<0.05$)。总体而言,本实验中有效钾、有效磷对 *nirK* 基因反硝化群落结构的影响最显著。此外,由采样点投射到各理化性质上的投影点可知,阿西地区含高有机质,麦溪地区含高有效钾、有效磷,分区地区各理化性质居中。而各采样点的连线段长度表示各采样点 *nirK* 反硝化细菌群落的相似程度,即麦溪地区与其他两个地区的连接距离较长,则其 *nirK* 反硝化菌群有明显的差异。

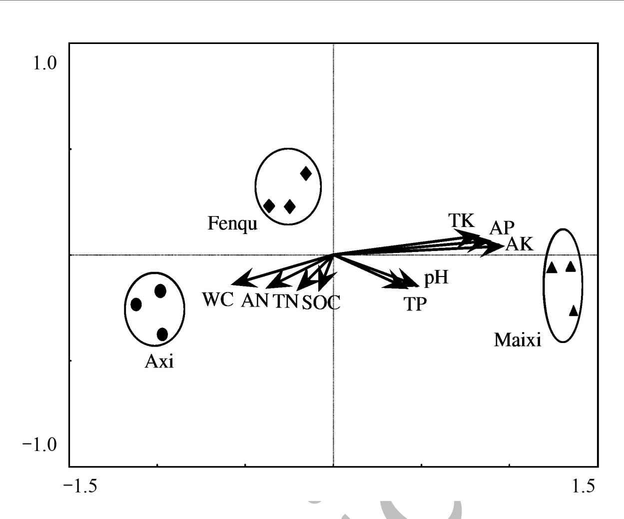


图 3　若尔盖高原湿地泥炭沼泽土 *nirK* 反硝化细菌群落结构的 RDA 排序图

Fig.3　RDA ordination analysis of the *nirK* denitrifier communities in the peat marsh soil in Zoige plateau wetland

WC:水分含量 Water content;SOC:土壤有机碳 Soil organic carbon;TN:总氮 Total nitrogen;TP:总磷 Total phosphorus;TK:总钾 Total potassium;AN:有效氮 Available nitrogen;AP:有效磷 Available phosphorus;AK:有效钾 Available potassium

3　讨论

环境因子如土壤含水量,pH 和营养成分等是影响反硝化作用和反硝化细菌种群组成和多样性的重要因素,本文皮尔逊相关分析显示:反硝化活性与土壤有机质、总氮和总磷都呈极显著相关(表 3)。已有研究表明[26],反硝化活性的高低取决于提供给细菌生长的有机质的质量与数量。在污水灌溉的农田里检测反硝化活性结果显示,影响反硝化活性的主要环境因子是总氮含量[27]。White[28]等人在研究被水覆盖 40a 的泥炭沼泽土反硝化活性时发现:总磷含量与反硝化活性呈极显著相关性。上述研究结果与本文结果相似,显示若尔高高原湿地的反硝化活性受土壤理化性质特别是有机质、氮素和磷素的有效性的明显影响。

系统发育分析显示 *nirK* 反硝化菌群主要属于变形门。此外,若尔盖高原湿地不同地区泥炭沼泽土中的 *nirK* 反硝化菌群存在明显差异。其中,阿西地区分离的克隆子序列主要属于 α-变形门(Cluster 3-4),少部分属于 β-变形门。在 α-变形门中,以慢生型大豆根瘤菌属(*Bradyrhizobium japonicum*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)还有德沃斯氏菌属(*Devosia*)为主。与本文结果相似,Priemé 等[5]研究土耳其沼泽化潮土中亚硝酸盐微生物群落得出慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*, AJ002516)是该生境中的优势反硝化微生物类群。Saito 等研究也发现定向施无机肥的水稻土中 *nirK* 反硝化菌群除以上慢生型大豆根瘤菌属外还有红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*, YP782977)以及苍白杆菌属(*Ochrobactrum*, YP00137298)[29]。但德沃斯氏菌属(*Devosia*)未见相关报道。麦溪地区反硝化菌群主要为 β-变形门,少部分为 α-变形门,且主要为 β-变形门的产碱杆菌属(*Alcaligenes*)。与本文类似,Prieme 等人研究土耳其沼泽土壤中的反硝化细菌类群时,也得出 β-变形门细菌相对较少[5]。而分区地区的主要反硝化菌群不能确定其种属地位。结合本文的反硝化活性和系统发育分析结果,若尔盖高原湿地泥炭沼泽土的反硝化活性可能主要由 α-变形门细菌调控。与本文研究相似,Katsuyama 等人在研究不同森林土的反硝化活性和调控菌群时亦发现 α-变形门的反硝化菌是调控该类生境反硝化活性的主要菌群[30]。综上,若尔盖高原湿地泥炭沼泽土中存在多样化的反硝化菌群,原因可能是这些泥炭沼泽土微域生境条件如理化性质、含水量和含氧量及氧化还原电位存在差异而导致[3]。

环境因子是影响微生物群落结构变化的重要因子,研究土壤微生物群落结构与土壤理化性质间的相互关系对于深入认识土壤微生物在生态系统中扮演的角色和功能具有重要意义[31]。RDA 分析显示有效钾和有效磷是影响若尔盖高原湿地泥炭沼泽土 *nirK* 反硝化细菌群落结构的主要因子。Zhang 等[32]对青藏高原草甸土 *nirK* 反硝化细菌群落研究发现,温度、水含量以及 C/N 比是影响 *nirK* 反硝化细菌群落结构的主要因子。而

Xie 等[33]研究青藏高原草甸土上放牧对反硝化细菌群落结构的影响发现土壤有机碳和硝态氮是影响 *nirK* 反硝化细菌群落结构的重要因子。而与本文结果相似,如 Barta 等[34]研究发现森林土壤中有效磷对 *nirK* 反硝化细菌群落结构有显著影响($r=0.83$, $P<0.001$)。Xue 等[35]研究表明有效钾是影响有机农业土壤 *nirK* 反硝化细菌群落的重要因子。此外,相关研究也表明:当有效磷和有效钾作为土壤限制营养因子时,会诱导溶磷溶钾微生物分泌相关酶类释放土壤中的磷、钾元素,改善土壤微域生境,进而反过来调控这些微生物的种群和数量[36-37]。综上,磷、钾元素作为生命活动的重要营养因子,它们与受微生物调控的氮素生物地球化学循环可能存在非常复杂的作用关系,这些关系的解释尚须进一步研究证实。

本文分析了若尔盖高原湿地泥炭沼泽土反硝化活性和 *nirK* 反硝化细菌群落结构和多样性及影响因子。研究显示 *nirK* 基因反硝化菌群主要属于变形门菌,该区域的反硝化活性主要受 α-变形门反硝化菌群影响。土壤有效钾和有效磷是影响 *nirK* 基因反硝化菌群落结构的主要环境因子。

参考文献(References):

[1] Conrad R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2, CO, CH_4, OCS, N_2O and NO). Microbiology Reviews, 1996, 60(4): 609-640.

[2] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(4): 533-616.

[3] Wolsing M, Priemé A. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48(2): 261-271.

[4] Braker G, Zhou J Z, Wu L, Devol A H, Tiedje J M. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2096-2104.

[5] Priemé A, Braker G, Tiedje J M. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1893-1900.

[6] Keil D, Meyer A, Berner D, Poll C, Shcützenmeister A, Piepho H P, Vlasenko A, Philippot L, Schloter M, Kandeler E, Marhan S. Influence of land-use intensity on the spatial distribution of N-cycling microorganisms in grassland soils. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 77(1): 95-106.

[7] Scala D J, Kerkhof L J. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. FEMS Microbiology Letter, 1998, 162(1): 61-68.

[8] Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, Senoo K. Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(10): 2044-2051.

[9] Robertson G P, Paul E A, Harwood R R. Greenhouse gases in intensive agriculture: contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. Science, 2000, 289(5486): 1922-1925.

[10] Huo L L, Chen Z K, Zou Y C, Lu X G, Guo J W, Tang X G. Effect of Zoige alpine wetland degradation on the density and fractions of soil organic carbon. Ecological Engineering, 2013, 51: 287-295.

[11] 张晓云, 吕宪国, 顾海军. 若尔盖湿地面临的威胁、保护现状及对策分析. 湿地科学, 2005, 3(4): 292-297.

[12] 罗清, 彭国照. 若尔盖及其邻近地区气候变化对湿地生态环境的影响. 高原山地气象研究, 2008, 28(3): 44-48.

[13] 陈槐, 高永恒, 姚守平, 吴宁, 王艳芬, 罗鹏, 田建卿. 若尔盖高原湿地甲烷排放的时空异质性. 生态学报, 2008, 28(7): 3425-3437.

[14] 王德宣. 若尔盖高原泥炭沼泽二氧化碳、甲烷和氧化亚氮排放通量研究. 湿地科学, 2010, 8(3): 220-224.

[15] Zhang G S, Tian J Q, Jiang N A, Guo X P, Wang Y F, Dong X Z. Methanogen community in Zoige wetland of Tibetan plateau and phenotypic characterization of a dominant uncultured methanogen cluster ZC-I. Environmental Microbiology, 2008, 10(7): 1850-1860.

[16] Zhou W J, Lu X F, Wu Z K, Deng L, Jull A J T, Donahue D, Beck W. Peat record reflecting Holocene climatic change in the Zoigê Plateau and AMS radiocarbon dating. Chinese Science Bulletin, 2002, 47(1): 66-70.

[17] Hartemink A E, Janssen B H, Buresh R J, Jama B. Soil nitrate and water dynamics in Sesbania fallows, weed fallows, and maize. Soil Science Society of America Journal, 1996, 60(2): 568-574.

[18] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 125-510.

[19] Liu H, Dasgupta P K. Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop. Analytical Chemistry, 1996, 68(11): 1817-1821.

[20] Dambreville C, Hallet S, Nguyen C, Morvan T, Germon J C, Philippot L. Structure and activity of the denitrifying community in a maize-cropped field fertilized with composted pig manure or ammonium nitrate. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 56(1): 119-131.

[21] Chen Z, Luo X Q, Hu R G, Wu M N, Wu J S, Wei W X. Impact of long-term fertilization on the composition of denitrifier communities based on

nitrite reductase analyses in a paddy soil. Microbial Ecology, 2010, 60(4): 850-861.
[22] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, Moffett B F. Using ecological diversity measures with bacterial communities. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43(1): 1-11.
[23] Good I J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. Biometrika, 1953, 40(3/4): 237-264.
[24] Qiu X Y, Wu L Y, Huang S H, McDonel P E, Palumbo A V, Tiedje J M, Zhou J Z. Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(2): 880-887.
[25] Palmer K, Drake H L, Horn M A. Genome-derived criteria for assigning environmental *narG* and *nosZ* sequences to operational taxonomic units of nitrate reducers. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15): 5170-5174.
[26] Jahangir M M R, Khalil M I, Johnston P, Cardenas L M, Hatch D J, Butler M, Barrett M, O'flaherty V, Richards K G. Denitrification potential in subsoils: a mechanism to reduce nitrate leaching to groundwater. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2012, 147: 13-23.
[27] Guo G X, Deng H, Qiao M, Yao H Y, Zhu Y G. Effect of long-term wastewater irrigation on potential denitrification and denitrifying communities in soils at the watershed scale. Environmental Science and Technology, 2013, 47(7): 3105-3113.
[28] White J R, Reddy K R. Nitrification and denitrification rates of Everglades wetland soils along a phosphorus-impacted gradient. Journal of Environmental Quality, 2003, 32(6): 2436-2443.
[29] Saito T, Ishii S, Otsuka S, Nishiyama M, Senoo K. Identification of novel Betaproteobacteria in a succinate-assimilating population in denitrifying rice paddy soil by using stable isotope probing. Microbes and Environments, 2008, 23(3): 192-200.
[30] Katsuyama C, Kondo N, Suwa Y, Yamagishi T, Itoh M, Ohte N, Kimura H, Nagaosa K, Kato K. Denitrification activity and relevant bacteria revealed by nitrite reductase gene fragments in soil of temperate mixed forest. Microbes and Environments, 2008, 23(4): 337-345.
[31] Ruiz-Rueda R O, Trias M R, Garcia-Gil L J, Bañeras L. Diversity of the nitrite reductase gene *nirS* in the sediment of a free-water surface constructed wetland. International Microbiology, 2007, 10(4): 253-260.
[32] Zhang Y G, Li D Q, Wang H M, Xiao Q M, Liu X D. The diversity of denitrifying bacteria in the alpine meadow soil of Sanjiangyuan natural reserve in Tibet Plateau. Chinese Science Bulletin, 2006, 51(10): 1245-1254.
[33] Xie Z, Le Roux X, Wang C P, Gu Z K, An M, Nan H Y, Chen B Z, Li F, Liu Y J, Du G Z, Feng H Y, Ma X J. Identifying response groups of soil nitrifiers and denitrifiers to grazing and associated soil environmental drivers in Tibetan alpine meadows. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 77: 89-99.
[34] Bárta J, Melichová T, Vaněk D, Picek T, Šantrůčková H. Effect of pH and dissolved organic matter on the abundance of *nirK* and *nirS* denitrifiers in spruce forest soil. Biogeochemistry, 2010, 101(1/3): 123-132.
[35] Xue K, Wu L Y, Deng Y, He Z L, Van Nostrand J, Robertson P G, Schmidt T M, Zhou J Z. Functional gene differences in soil microbial communities from conventional, low-input, and organic farmlands. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(4): 1284-1292.
[36] 王斐, 李菊梅, 戴建军, 马义兵. 有机结合态磷肥对土壤微生物及磷酸酶的影响. 化肥工业, 2013, 40(3): 3-9.
[37] McGill W B, Cole C V. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. Geoderma, 1981, 26(4): 267-286.